

جداسازی و شناسایی *Yersinia ruckeri* با روش بیوشیمیایی API 20E و تأیید تشخیص با روش 16SrDNA PCR- Sequencing در ماهی قزل آلا

رنگین کمان در شمال ایران

مصطفی جعفرپور^{۱*}، مرتضی موسی زاده سرقین^۲، علی ناظمی^۳، شیفته عربی^۴، زهیر حشمتی پور^۵

۱، ۲، ۴، ۵ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی، تنکابن، ایران، صندوق پستی ۴۶۸۱۵/۶۴۶

۳ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه ژنتیک، تنکابن، ایران، صندوق پستی ۴۶۸۱۵/۶۴۶

تاریخ پذیرش: ۲۹ اردیبهشت ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۲۸ بهمن ۱۳۹۱

چکیده

Yersinia ruckeri عامل بیماری Enteric Red Mouth (ERM) یا یرسینیوزیس می باشد و باعث سپتی سمی در بیشتر آزادماهیان می گردد. این بیماری گسترش جهانی زیادی دارد و باعث ضررهای اقتصادی در صنعت پرورش ماهی می شود. بنابراین شناسایی دقیق پاتوژن برای کنترل بیماری در ماهی ضروری است. بر اساس علائم بالینی اپیدمی از بیماری در ماهی های قزل آلا رنگین کمان در شهر تنکابن در ایران رخ داده است. در این تحقیق ما جهت شناسایی *Yersinia ruckeri* از کشت آزمایشگاهی از روش بیوشیمیایی API 20E galleries و جهت تأیید این تشخیص از روش 16SrDNA PCR- Sequencing با استفاده از پرایمر universal استفاده کرده ایم. در مقایسه با تحقیق بیوشیمیایی مشابه در رومانی که *Yersinia ruckeri* را با استفاده از API20E galleries شناسایی کرده و مقادیر عددی مرتبط با هر گروه از ۵، ۱۰۴، ۱۰۰ در رومانی تا ۵، ۱۰۵، ۱۰۰ در ایران متغیر بود این تفاوت به واسطه تست VP مثبت در تحقیق ما و تست VP منفی در تحقیق رومانی بود. یکی از دقیق ترین روش های شناسایی 16Sr DNA PCR- Sequencing با استفاده از پرایمر universal می باشد. این تحقیق اولین شناسایی بیوشیمیایی *Yersinia ruckeri* توسط کیت API 20E galleries را گزارش می دهد که تأیید آن با روش 16SrDNA PCR- Sequencing امکان پذیر شده است.

کلمات کلیدی: قزل آلا رنگین کمان، یرسینیاروکری، API20E، گالری، بیماری دهان قرمز، پی سی آر سکونسینگ.

مقدمه

Yersinia ruckeri عامل بیماری Enteric Red Mouth (ERM) و یا یرسینیوریس است که عفونتی به صورت سپتی سمی می‌باشد و بر آزادماهیان تاثیر می‌گذارد (Fernandez, et al., 2007). این بیماری گسترش زیادی دارد و باعث ضررهای اقتصادی در صنعت پرورش ماهی می‌شود (Altinok, et al., 2008; Austin, 2007). ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان جوان بیشترین حساسیت را به عفونت دارند. منابع آلودگی ماهی‌های ناقل و بیمار هستند که عامل بیماری را می‌توان از مدفوع و آب و غذای آلوده آن‌ها جداسازی نمود (Guguianu, et al., 2009). *Yersinia* جزء باکتری‌های بدون اسپور و کوکوباسیلوس گرم منفی و متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که اغلب متحرک و میله‌ای شکل است (Roozbahani, et al., 2009; Tobback, et al., 2007). این باکتری باعث بروز سپتی سمی، علائم و آسیب همراه با بی‌اشتهایی، بی‌حسی، سیاهی غیر طبیعی پوست، آب آوردن شکم، بزرگی غیر طبیعی طحال می‌شود. آسیب‌های مشخص که توسط یرسینیوزیس ایجاد می‌شود عبارتند از: زردی روده، خونریزی در باله‌ها و چشم‌ها، انباشت مایع داخل معده و روده، بیرون زدگی دو جانبه چشم‌ها و بزرگی غیرطبیعی طحال می‌باشد (Altinok, et al., 2008; Tobback, et al., 2007). به طور مرسوم تشخیص بیماری براساس ویژگی‌های فنوتیپی و سرم‌شناسی عامل بیماری‌زا و یا آزمایشات بافت‌شناسی انجام می‌شود (Bernardet, et al., 1990). بعضی کوشش‌ها بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفته است اما این تکنیک‌ها عیوبی چون حساسیت کم جهت شناسایی عامل بیماری‌زا را دارا هستند (Falsey, et al., 2007).

تشخیص دقیق و سریع در ماهیان بدون علامت بیماری جهت پیشگیری بسیار حیاتی است (Wilson and Carson, 2003). تکنیک ملکولی هم‌چون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) می‌تواند برای حل این مشکلات و افزایش حساسیت و شناسایی اختصاصی پاتوژن استفاده شود. روش‌های PCR متعددی برای تشخیص *ruckeri* پیشنهاد شده است که شامل PCR ساده، PCR- RFLP، ELISA، PCR می‌باشند (Roozbahani, et al., 2009). در این تحقیق شناسایی بیوشیمیایی *Yersinia ruckeri* توسط API 20E galleries و تائید این تشخیص توسط روش 16Sr DNA PCR- Sequencing مورد آزمایش قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

منابع ماهی و جداسازی باکتری

ابتدا از ۳۳ مرکز مختلف پرورش ماهی قزل‌آلا رنگین کمان موجود در شهرستان تنکابن واقع در شمال ایران از موارد مشکوک به بیماری یرسینیوزیس که دارای علائم بالینی هم‌چون تیره‌گی غیر طبیعی پوست، رنگ پریده‌گی آبشش‌ها و مخاط دهان، خون مرده‌گی در زبان، خونریزی چشمی و بیرون زدگی دو جانبه چشم‌ها بودند از اندام‌های درونی مثل قلب، کبد، کلیه و طحال آن‌ها نمونه‌برداری شد و سپس این نمونه‌ها در محیط آگارخوندار کشت داده شدند و بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای 25°C - 22°C انکوبه شدند.

آزمایش بیوشیمیایی سویه‌های جدا شده

بعد از دوره انکوباسیون کلنی‌ها از لحاظ ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار

extension به مدت ۴۰ ثانیه در دمای 72°C و در انتها واکنش به مدت ۵ دقیقه در 72°C صورت گرفت.

Sequencing

در این مرحله محصول PCR (ژن سنتز شده) را به شرکت ماکروژن کره ارسال کردیم تا تعیین توالی نوکلئوتیدها یا Sequencing صورت گیرد و بعد از تعیین توالی توسط این شرکت جواب حاصله را در سایت NCBI در قسمت BLAST ارزیابی کردیم.

نتایج

در بررسی قسمت‌های خارجی ماهی، آسیب عمومی در همه ماهی‌ها عبارت بود از: رنگ پریده گی آبشش‌ها و مخاط دهان خون‌مردگی در زبان و خونریزی چشمی بود. آسیب درونی با فقدان جیره غذایی و نفخ و انبساط گازی مجرای هضمی، بزرگی غیر طبیعی طحال، خون‌مردگی در کبد به نمایش در می‌آید. بعد از این که از اندام‌های داخلی مثل کبد، کلیه، قلب و طحال نمونه‌برداری شد این نمونه‌ها را وارد محیط بلاداآگار نمودیم بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم بعد از دوره انکوباسیون کلنی‌ها سفید و خاکستری و کوچک و واحد بودند و هم‌چنین حالت "S" داشتند و در بررسی میکروسکوپی گرم منفی، با اندازه متوسط که گرده‌های خاصی از باسیلوس و کوکوباسیلیوس بودند. و براساس تست اکسیداز منفی و تست کاتالاز مثبت برای میکروب‌های جدا شده کیت بیوشیمیایی API20Egalleris انتخاب شد ویژگی متابولیک برای باکتری‌های ایزوله شده با استفاده از کیت API20E در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

گرفتند و سپس جهت شناسایی سویه‌های جدا شده توسط کیت بیوشیمیایی API 20E galleries مورد آزمایش قرار گرفتند.

استخراج DNA از سویه‌های جدا شده

کلنی‌های باکتریایی جمع‌آوری شده از محیط کشت در سوسپانسیون $100\mu\text{l}$ ddH₂O حل شدند سپس DNA طی روش جوشاندن (Nazemi, et al., 2001) استخراج شده و سپس ۱۵ دقیقه در 14000rpm سانتریفیوژ شدند و سپس supernatant برای استفاده در واکنش PCR جمع‌آوری شدند.

پرایمرها

از پرایمر 16S rRNA universal برای شناسایی باکتری‌های حقیقی استفاده شد:

Forward primer:

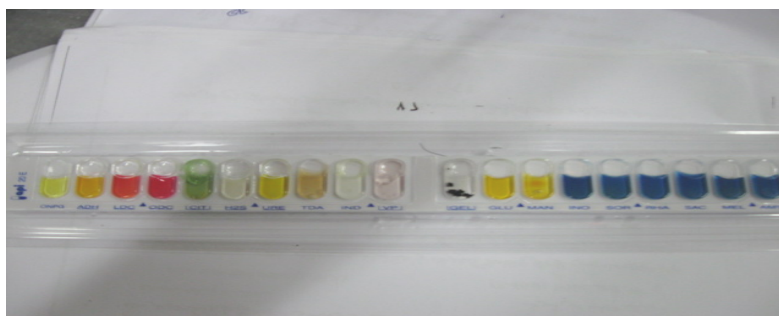
5' – AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'

Reverse primer:

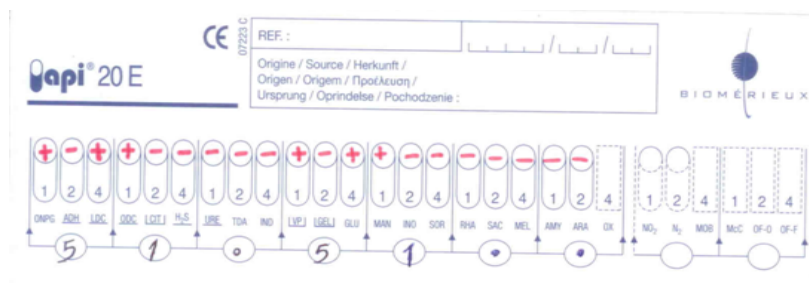
5' – AACTGGAGGAAGGTGGGGA-3'

واکنش PCR

حجم نهایی واکنش $25\mu\text{l}$ می باشد محتویات PCR شامل $14\mu\text{l}$ ddH₂O: $2/5\mu\text{l}$ بافر 10X و $1\mu\text{l}$ Mgcl₂ (50mM) و $1\mu\text{l}$ dNTPs (10mM) و پرایمر MiX (10 pmol) و $5\mu\text{l}$ Template DNA است واکنش PCR را به صورت زیر تنظیم شد. Denaturation به مدت ۴ دقیقه در 95°C ، ۳۵ سیکل از دناتوره شدن در 95°C به مدت ۱۰ ثانیه، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و



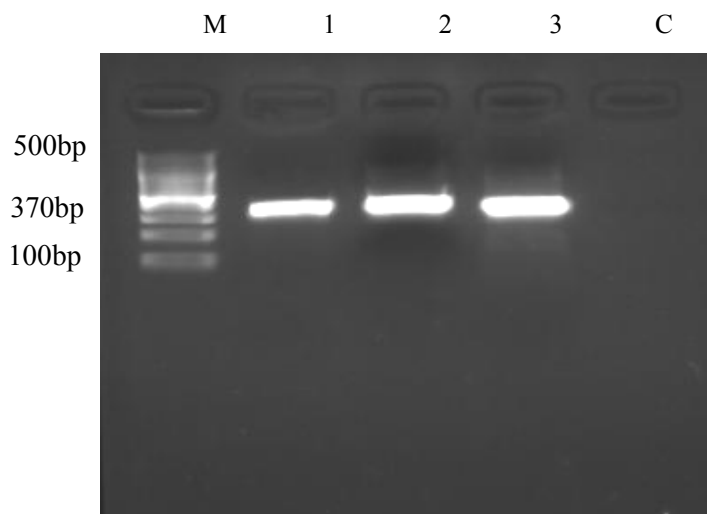
شکل ۱: نمای ظاهری کیت بعد از ۲۴ ساعت از تلقیح کلن



شکل ۲: نتایج حاصله از کیت بیوشیمیایی API20E Galleries

DNA صورت پذیرفت و واکنش PCR توسط پرایمرهای 16Sr RNA universal انجام شد و محصول PCR را به ژل آگارز ۱/۵٪ منتقل کردیم و قطعه ۳۷۰bp را بعد از رنگ آمیزی با ایتدیوم بروماید مشاهده کردیم (شکل ۳) نمونه‌های مشاهده شده در این قطعه برای Sequencing یا تعیین توالی نوکلئوتید به شرکت کراهی ماکروژن فرستاده شد.

در نتیجه مقادیر عددی وابسته به واکنش مثبت هر گروه ما نسبت‌های ترکیبی روبرو را به دست آورده‌ایم: ۵، ۱۰۵ و ۱۰۰ از آن‌جا که در جدول API20Egalleries این نمودار عددی مربوط به *Hafnia alvei* و *Yersinia ruckeri* تست کاملی از تخمیر گزیلوز را برای تفکیک این دو باکتری اجراء کردیم. بعد از تأیید بیوشیمیایی *Yersinia ruckeri* آزمایشات استخراج



شکل ۳: Detection of *Yersinia ruckeri* by 16SrRNA universal primer Lane M, 100bp ladder marker; Lane 1, 2, 3 positive sample; lane C Negative control containing PCR reagent alone

نتیجه حاصل از sequencing توسط شرکت
BLAST مورد ارزیابی قرار دادیم نتیجه تأیید *Yersinia ruckeri* به صورت زیر می باشد (شکل ۴).

نتیجه حاصل از sequencing توسط شرکت
ماکروژن را در سایت اینترنتی NCBI در قسمت

> [ref|NZ_AC000097.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuotide/ref/NZ_AC000097.1) *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 contig00382, whole genome shotgun sequence

[gb|AC000097.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuotide/gb/AC000097.1) *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 contig00382, whole genome shotgun sequence > [ref|NZ_AC000097.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuotide/ref/NZ_AC000097.1) *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 contig00382, whole genome shotgun sequence

[gb|AC000097.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuotide/gb/AC000097.1) *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 contig00382, whole genome shotgun sequence

Length=950

Score = 588 bits (318), Expect = 2e-165

Identities = 318/318 (100%), Gaps = 0/318 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query
TACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTA 1
|||||
Sbjct
TACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTA 856
797
```

```
Query
CCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 61
|||||
Sbjct
CCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 120
737
```

Query	121
CGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAG	180
Sbjct 736 CGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAG	
677	
Query	181
TTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGTGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTC	240
Sbjct 676 TTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGTGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTC	
617	
Query	241
GCTTCACTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATG	300
Sbjct 616 GCTTCACTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATG	
557	
Query 301 ACTTGACGTCATCCCCAC 318	
Sbjct 556 ACTTGACGTCATCCCCAC 539	

شکل ۴: نتیجه حاصل از تجزیه و تحلیل توالی توسط نرم افزار بلاست

بحث

تحت شرایط ایده آل، ماهی که به نظر سالم است و نشان بالینی از آسیب ندارد می تواند حامل پاتوژن هایی باشد که خطرات جدی برای شیوع بیماری واگیر باشد و به نظر می رسد که یرسینوزیس در بین جمعیت های ماهی ها گسترش جهانی دارد (Roozbahani, et al., 2009). بیماری زمانی رخ می دهد که شرایط استرس زا رخ دهد بنابراین شناسایی دقیق پاتوژن از ماهی برای کنترل اثر بخشی بیماری موجود در ماهی ضروری است (Altinok, et al., 2008). یک اپیدمی حاصل از بیماری در شهر تنکابن ایران رخ داد. در این تحقیق ما جهت شناسایی *Yesinia ruckeri* از کشت آزمایشگاهی علاوه بر روش بیوشیمیایی API20E galleries از روش PCR-Sequencing 16SrDNA با استفاده از پرایمر universal برای تأیید تشخیص استفاده کرده ایم در مقایسه با تحقیق بیوشیمیایی مشابه

در رومانی *Yesinia ruckeri* را با استفاده از API 20 Egalleries شناسایی کرده و مقادیر عددی مرتبط با هر گروه ۵، ۱۰۴ و ۱۰۰ در رومانی تا ۵، ۱۰۵ و ۱۰۰ در ایران متغیر بود این تفاوت به واسطه تست VP مثبت در تحقیق ما و تست VP منفی در تحقیق رومانی بود. ملاحظه نتایج بدست آمده نشان داد که سویه های جدا شده در ایران از سویه های جدا شده در رومانی متفاوتند. PCR توانایی شناسایی سلول های زنده کشت پذیر و غیر قابل کشت را دارند. یکی از دقیق ترین روش های شناسایی با 16SrDNA PCR- Sequencing استفاده از پرایمر universal می باشد. این تحقیق اولین شناسایی بیوشیمیایی *ruckeri* توسط کیت API 20E galleries را گزارش می دهد و تأیید آن با 16 Sr DNA PCR-Sequencing امکان پذیر ساخته است.

منابع

1. Altinok, I., Capkin, E., Kayis, S., 2008. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Veterinary Microbiology*, vol. 131, pp. 332-338.
2. Austin, B., Austin, D. A., 2007. *Bacterial Fish pathogens diseases of farmed and wild Fishes*. fourth ed. Praxis Publishing Ltd., chichester.uk.
3. Bernardet, J.F., Campbell, A.C., Buswell, J.A., 1990. *Flexibacter maritimus* is the agent of black patch necrosis in *dover sole* in Scotland, *Dis. Aquat. Org.* vol. 8, pp. 233-237.
4. Fernandez, L., Mendez, J., Agustin, J., 2007. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Veterinary microbiology*. vol. 125, pp. 1-10.
5. Falsey, A., Y. Murata., E. Walsh., 2007. Impact of rapid diagnosis on management of adults hospitalized with influenza. *Arch. Intern. Med.* vol. 167, pp. 354-360.
6. Guguianu, E., Vulpe, V., Lazar, M., 2009. Yersiniosis outbreak in rainbow trout at a fish farm from northern Romania. *Cercetari agronomice in Moldova*. vol. xll, no. 3, pp. 75-80.
7. Nazemi, A., Mirinargasi, Merikhi, N., 2001. Distribution of pathogenic genes *astA*, *aaP*, *aggR*, among uropathogenic *E. coli* and their linkage with *stab* gene, *Indian. J. Microbiol.* vol. 51, pp. 355-388.
8. Roozbahani, M. R., Bandehpour, M., Haghighi, A., 2009. PCR- Based Detection of *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout fish, *Asian. Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 4, pp. 258-262.
9. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, F., 2007. *Yersinia Ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish. Dis.* vol. 30, pp. 257-268.
10. Wilson, T., Carson, J., 2003. Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR – enzyme hybridization assays to detect selected bacterial fish pathogens. *Dis. Aquat. Organ.* vol. 54, pp. 127-134.